

Année 1964

N°

482

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

CHRISTIAN, JEAN-PIERRE LAFAIX

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 13 Août 1932, à la Chatre (Indre)

Présentée et soutenue publiquement le

1964

**APPLICATIONS de l'IMMUNO-FLUORESCENCE
au DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
et SÉROLOGIQUE de la COQUELUCHE**

Président : M. R. BASTIN, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

CHRISTIAN, JEAN-PIERRE LAFAIX

Interne des Hôpitaux de Paris

Né le 13 Août 1932, à la Chatre (Indre)

Présentée et soutenue publiquement le

1964

**APPLICATIONS de l'IMMUNO-FLUORESCENCE
au DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
et SÉROLOGIQUE de la COQUELUCHE**

Président : M. R. BASTIN, Professeur

THESE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE

PAR

CH. J. VAN DER WOUDE



APPLICATIONS DE L'IMMUNOLOGIE
AU DIAGNOSTIC BACTÉRIEN
ET SÉROLOGIQUE DE LA COQUELLOUX

Monsieur le D. J. VAN DER WOUDE

1

•

Gaston CORDIER

Daniel BARGETON

Paul CASTAIGNE

4

1°.- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a.- Professeurs Titulaires :

MM.

DELMAS (A.)

DELARUE (J.)

BAUMANN (J.) "

JAYLE 5M.F.)

MALMEJAC (J.)

FAUVERT (R.)

BUGNARD (L.)

DJOURNO (A.)

DOGNON (A.)

BERNARD (J.)

SCHAPIRA (G.)

TUCHMANN (H.)

N . . .

JOANNON (P.)

GIROUD (A.)

BOYER (J.)

DESOILLE (H.)

DEROBERT (L.)

FASQUELLE (R.)

BRUMPT (L.C.)

LAURENCE (G.)

N . . .

MERKLEN (F.P.)

LAROUCHE (Cl.)

BRICAIRE (H.)

TURIAF (J.)

Pathologie et thérapeutique générales	DEPARIS (M.)
Pharmacologie	CHEYMOL (J.)
Physiologie	BARGETON (D.)
	PARROT (J.)
Physiologie et Pathologie Obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée	LAMOTTE (M.)

b.- Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Biochimie médicale	DESGREZ (P.)
	COLONOVSKI (J.)
Biologie médicale	BOURLIERE (F.)
Pharmacologie	LEVY (Mlle J.)
Physiologie	DEJOURS (P.)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L.)
	GOUGEROT (L.)
Radiologie médicale	FISCHGOLG (H.)

2°.- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a.- Professeurs titulaires

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIE (P.)
	LORTAT-JACOB (J.L.)
	LEGER (L.)
Clinique Chirurgicales	PATEL (J.)
	CORDIER (G.)
	GOSSET (J.)
	SICARD (A.)
	OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et ortho. (E. malades)	FEVRE (M.)
Clinique chirurgicale ortho. et traumatique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNE
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie Pleuro-pulmon. (Laennec)	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECCOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enfants malades)	LAMY (M.)
Clinique Gynécologique (Broca)	HUGUER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphi. (St. Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies d'enfants (Enfants malades)	TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Cl. Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et encéphales (Ste Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)

Cliniques médicales	- Broussais	MILLIEZ (P.)
	- Brousseis	LENEGRE (J.)
	- Cochin	BROUET (G.)
	- Hôtel Dieu	BARIETY (M.)
	- Lariboisière	SEZE (S.de)
	- Pitié	DREYFUS (G.)
	- Saint Antoine	KOURILSKY (R.)
	- Saint Antoine	BOUDIN (G.)
Clinique d'hydrologie et climatologie (Bichat)		DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile de péd.sociale (E.Malades)		MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)		JUSTIN-BESANCON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel Dieu)		DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)		DAVID (M.)
Cliniques neurologiques (Salpêtrière)		GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales (Baudelocque)		LACOMME (M.)
		MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port Royal)		VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel Dieu)		RENARD (G.)
(Cochin)		OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)		AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et puericulture (St.Vincent de Paul)		N...
Clinique de pneumo-phthisicologie (Laennec)		BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)		MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)		COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)		ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (St Antoine)		LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique		GAUTIER (M.)
Clinique urologique (Cochin)		ABOULKER (P.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique		PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale		DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicale		POILLEUX (F.)
Séméiologie traumatique et orthopédique		JUDET (R.)
Clinique urologique (Necker)		COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)		N...

b.- Professeurs à titre personnel :

Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	LAMBLING (A.)
	LHERMITTE (F.)
	PEQUIGNOT (H.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F.)
	WORMS (R.)

Oto-rhino-laryngologie
Pneumo-phtisiologie
Rhumatologie

MADURO (R.)
KREIS (B.)
DELBARRE (F.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES et
MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

Anatomie	CABROL (C.)	Hydrologie	BESANCON (F.)
	COUINAUD (C.)		CORNET (A.)
	GILLOT (C.)		
	HUREAU (J.)	Hygiène	BLANCHER (G.)
Anatomie	GAUTHIER VILLARD (Mlle)		CORRE-HURST (Mme L.)
pathologique	ABELANET (R.)		ROUSSEL (A.)
	CHOMETTE (G.)		SAPIN JALOUSTRE (H.)
	GOUYGOU (Ch.) pr.s.ch.	Maladies infectieuses	DUPONT (V.)
	NEZELOFF (Ch.)		LISSAC (J.)
	ORCEL (L.)		RAPIN (M.)
	PAILLAS (J.)	Maladies métaboliques	ANTOINE (B.)
anesthésiologie	KERN (E.)		CROSNIER (J.)
	N. du BOUCHET (Mme)		RICHER (G.)
	VOURC'H (G.)		SEBAOUN (J.)
Bactériologie	BARBIER (P.) pr.s.ch.	Médecine légale	BOURGUIGNON (A.)
	CHRISTOL (D.)		FOURNIER (E.)
	DAGUET (G.)		GUENIOT (M.)
	LE MINOR (L.)		HADENGUE (A.)
	TOURNIER (P.)	Médecine du travail	ALBAHARY (C.)
Biochimie médicale	BAULIEU (Et.) M; Cf.	Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)
	BOURILLON (R.)	Neuro-Psychiat.	CAMBIER (J.)
	CARTIER (P.) pr.s.ch.		CATHALA (H.)
	CORNILLOT (P.)		ESCOURQLE (R.)
	DREYFUS (J.Cl.)		GAUTIER (J.Cl.)
	GONNARD (P.)		LAPRESLE (J.)
	JEROME (H.)		LEREBOULET (J.)
	KRUH (J.)		PICHOT (P.)
	LEGRAND (J.Cl.)		TARDIEU (G.)
	NORDMANN (J.)		
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	PLAS (F.)	Obstetrique	GRANJON (A.)
Biologie médicale	BENHAMOU (J.P.)		HERVET (E.)
	BOIVIN (P.)		LE LORIER (G.)
	HARTMANN (L.) pr.s.ch.		LEVY (J.)
			LEWIN (D.)
Carcinologie	BOIRON (M.)		MUSSET (R.)
	DENOIX (P.)		ROBEY (M.)
	MATHE (G.)		SENEZE (J.)
	SELIGMANN (M.)		SUREAU (C.)

Cardiologie	HATT (P.Y.)		TCHOBROUTSKY (Mme C.)
Dermato- Syphigraphie	CIVATTE (J.) DUPERRAT (B.) HEWITT (J.) TOURAINE (R.)	Ophthalmologie	TWOYER ROZAT (J.) AUVERT (Mme B.) BREGIAT (P.) DUBOIS (A.) FONTAINE (Mme M.) SARAUX (H.)
Electre- radiologie	HEITZ (F.) M. Conf. LEDoux LEBARD (G.)		
Embryologie	ROUX (Ch.)	Orthopédie	DUPARC (J.) MAURER (P.) MEARY (R.) POSTEL (M.) RAMADIER (J.)
Hématologie	BESSIS (M.) BILSKI PASQUIER (G.) DAUSSET (J.) DUHAMEL (G.)		
Histologie	COUJARD (R.) pr. s. ch. DA LAGE MAROIS (M.) RACADOT (J.) SCHRAMM (B.)	Oto-Rhino-Laryngologie Parasitologie	DEBAIN (J.) PIALOUX (P.) SERGENT (H.) GOLVAN (Y.) HO THI SANG (Mlle) LAPIERRE (J.)
Pathologie Chirurgicale	BARCAT J. BINET J.P. BLONDEAU Ph. CERBONNET G. CHATELIN C.L. DAUTRY P. DEMIRLEAU DUBOST Cl. FAUREL J. FLABEAU F. GALEY J.J. GARBAY M. GARNIER H. GAUDART d'ALLAINES GERMAIN A. LATASTE J. LOYGUE J. MAILLARD J.N. MERCADIER M. NATALI J. PELLERIN D. PERROTIN J. PREMONT M. ROBERT H. THOMERET G. VAYSSE J.	Pédiatrie Puericulture	ALAGILLE D. ALISON J. CANLORBE P. GORIN R. LAFOURCADE J. LEPERCQ G. LESTRADET H. MALLET R. MANDE R. MINKOWSKY A. MOZZICONACCI P. POLONOVSKI C. REY J. RIBIERRE M. ROSSIER A. VIALATTE J. BOISSIER J. LECHAT P. BARRES G. DURAND J. GIRARD FR. M. Cf. HUGELIN A. LAURENT D. SCHERRER J. pr. s. ch. VASSEUR B.

Pathologie Exotique

SCHNEIDER J.

Pathologie expérimentale

BERTAUX P.
COTTENOT Fr.
LOEPER J. pr.s.ch.
MAURICE J.
MIKOL Cl.
PAUPE J.R.

Physique médicale

CHANTEUR J.
COURSAGET J.
GREMY F.
MILHAUD G.
PAGES J. Cl.
PELLERIN P.
ROUCAYROL J.C.
TUBIANA M.

Pathologie médicale

ACAR J.
ADQIER L.
ACSSANNAIRE M.
BEAUMONT J.L.
BERNIER J.J.
BOUVIER J.
BOUVRAIN Y.
BRISAUD H.
BRÉCARD H.
BUGE A.
SCANIVET J.
CARLOTTI J.
CATINAT J.
CHRETIEN J.
CLOAREC M.
COBLENTZ B.
CONTAMIN F.
COURY C.
DEBRAY J.
ETIENNE J.P.
FREZAL J.
FRITEL D.

Pneumo phtisiologie

DECROIX G.
ISRAEL L.
MEYER A.
RENAULT P.
SORS Ch.

Psychiatrie infantile

DENIKER P.
DUCHE D.
FLAVIGNY H.

Radiologie médicale

DUBOST J.
LEFEBVRE J.
MICHEL J.R.

Rhumatologie

MASSIAS P.

Stomatologie

CAUHEPE J.
CERNEA P.
CHAPUT (Mme A.)
CREPY Cl.
FLEURY R.
GRELLET M.

Thérapeutique

FUNK BRENTANO J.L.

CHASSAGNE P.
FOUET P.
LABET R.
MARCHE J.

Urologie

GRIVAUX M.
HAZARD J.
HENNEQUET A.
HIMBERT J.
HOUSSET E.
LAGRUE G.
LESCBRE R.
LEVEQUE B.
MACREZ C.
MOREAU L.
NENNA A.
NICK J.
POULET J.
ROYER P.

AUVERT J.
MOULONGUET A.
QUENU L.

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent

Anatomie	DEBEYRE J.	Clinique ophtalmologique
Clinique chirurgicale		DESIGNES P.
	VERNE J.M.	Clinique pédiatrique et
Clinique médicale	RAMBERT P.	puériculture LAPLANE R.
	THIEFFRY S.	Clinique psychiatrique
Clinique obstétricale		BARUK. H.
	GRASSET J.	Clinique urologique
	MAYER M.	KUSS R.
	MORIN P.	

IV.- PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie	HAUDUROY P.	Pathologie chirurgicale	RUDLER J.
---------------	-------------	-------------------------	-----------

Professeur sans chaire

V.- CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

BOLTANSKI E.

LAUNAY J.

Secrétaire général de la faculté	M. LENA J.
Conseiller administratif	Melle CHAINTREUIL G.
Conservateur en chef de la bibliothèque	
Conservateur du Musée d'Histoire de la	
Médecine	M. le Docteur HAHN A.
Conservateurs	Melles DUMAITRE P. - LE NOIR G. - QUIEVREUX E.
Bibliothécaires	Mmes CONTET J. FORGET F.
	Melle LAURENT H. Dr. SCHILLER J.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MA FEMME,
A MES PARENTS,
A MES GRANDS - PARENTS,
A MES BEAUX-PARENTS,
A Henri et Denise VILATTE,
A MES ENFANTS,
A MES AMIS.

AVEC TOUTE MON AFFECTION.

A Monsieur le Professeur R. B A S T I N

Médecin de l'Hôpital Claude B E R N A R D

Je suis heureux de lui exprimer,
par ce travail, ma profonde gratitude pour son
enseignement et pour l'affectueuse sollicitude
avec laquelle il m'a toujours conseillé et guidé.

En témoignage de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur R. PASQUELLE SAINT-YVES MENARD

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine de

P A R I S

J'ai passé d'excellentes et fructueuses années
dans son laboratoire. Je lui dois ma formation bactériologique.

qu'il veuille bien trouver ici l'expression
de ma très vive reconnaissance.

Je tiens à remercier pour l'aide qu'ils m'ont apportée
dans l'élaboration de ce travail :

Monsieur le Professeur Agrégé L. LE MINOR
Chef de Service à l' INSTITUT PASTEUR ,

Il a bien voulu me faire bénéficier de sa
grande expérience. Je lui en exprime toute ma
reconnaissance.

Mademoiselle M. FAURE ,
Chef de Laboratoire à l' INSTITUT PASTEUR ,

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression
de ma respectueuse gratitude pour l'accueil bienveillant
qu'elle nous a réservé dans son laboratoire.

Monsieur le Docteur J. PILLOT
Chef de Laboratoire à l' INSTITUT PASTEUR,

Ses conseils éclairés m'ont aidé tout au long
de ce travail. Qu'il en soit bien vivement et amicalement
remercié.

A MES MAITRES DANS LES HÔPITAUX :

E x t e r n a t

Monsieur le Docteur	J.J. WELTI
Monsieur le Professeur	M. FEVRE
Monsieur le Professeur	P. SOULIE
Monsieur le Professeur	J. MARIE
Monsieur le Professeur	M. PERRAULT
Monsieur le Professeur	R. DEGOS
Monsieur le Professeur	J. GRASSET

I n t e r n a t

Monsieur le Docteur	R.A. MARQUEZY
Monsieur le Professeur	R. BASTIN
Monsieur le Docteur	C. LAUNAY
Monsieur le Docteur	J. NOUAILLE
Monsieur le Professeur	R. DEGOS
Monsieur le Professeur	J. MARIE
Monsieur le Professeur	R. LAPLANE
Monsieur le Docteur	A. LEMARIEY

En les remerciant de leur enseignement
et du plaisir que j'ai eu d'être leur élève .

A MES MAITRES :

Monsieur le Docteur CH. B A C H

Monsieur le Docteur J. D E L O R T

Monsieur le Docteur G. G A R N I E R

Monsieur le Professeur Agrégé A. H E N N E Q U E T

Monsieur le Docteur C. L A P R E S L E

Monsieur le Professeur Agrégé B. L E V Ê Q U E

Monsieur le Docteur H. M U L L E R

Monsieur le Docteur F. P A Q U E L I N

Monsieur le Professeur agrégé J. S C H N E I D E R

Monsieur le Professeur agrégé R. T O U R A I N E

Monsieur le Docteur F. V E R L I A C

Pour leur enseignement,

avec toute ma gratitude.

A mes Maîtres de la Chaire de Microbiologie :

Monsieur le Professeur P. B A R B I E R

Monsieur le Professeur D. C H R I S T O L

Monsieur le Professeur agrégé G. D A C U E T

Monsieur le Professeur agrégé L. L E M I N O R

Monsieur le Professeur agrégé P. T O U R N I E R

Avec l'expression de ma reconnaissance

et de mon attachement .

P L A N

- INTRODUCTION

- L'IMMUNO-FLUORESCENCE

1.- Historique

2.- Principes des différentes méthodes :

- 1° - La méthode directe
- 2° - La méthode indirecte
- 3° - La méthode anti-complémentaire
- 4° - La méthode d'inhibition de la fluorescence

3.- Modalités techniques et matériel utilisé

- 1° - La préparation des solutions d'anticorps conjugués
- 2° - Préparation des lames
- 3° - L'examen microscopique

4.- Les applications de l'immuno-fluorescence

5.- Difficultés de la méthode

- APPLICATIONS DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE AU DIAGNOSTIC

DE LA COQUELUCHE

1.- Analyse des travaux publiés :

- 1° - DE REPENTIGNY et FRAPPIER, 1956
- 2° - DONALDSON et WHITAKER, 1960
- 3° - KENDRICK, ELDERING, EVELAND, 1961
- 4° - J. MARIE, HERZOG, GAIFFE, 1962

II.- Travaux Personnels :

- 1.- Examen des prélèvements de gorge par immuno-fluorescence directe.

A.- Matériel et Méthodes

- 1° - Préparation de la solution d'anticorps conjugués, Contrôles effectués.
- 2° - Matériel optique utilisé
- 3° - Prélèvements
- 4° - Méthodes d'examen.

B.- Résultats de 60 prélèvements : Tableaux 1 à 4

C.- Discussion des résultats.

2.- Méthode de diagnostic sérologique de la coqueluche par immuno-fluorescence indirecte.

A.- Principe

B.- Matériel et méthodes :

- 1° - Préparation de la solution d'anticorps conjugués anti-gamma-globulines humaines. Contrôles effectués.
- 2° - Préparation des frottis de BORDETELLA PERTUSSIS (antigènes)
- 3° - Prélèvement des sérums examinés.
- 4° - Méthode d'examen.

C.- Résultats de l'examen des sérums de 32 enfants (37 sérums) - Tableaux 5 et 6.

D.- Discussion des résultats.

- C O N C L U S I O N S

INTRODUCTION

Le diagnostic bactériologique de la coqueluche par la méthode classique de culture des prélèvements pharyngés sur le milieu de BORDET-GENCOU est de pratique délicate. Le délai nécessaire avant d'obtenir la réponse est assez long (trois jours). Les résultats, enfin, sont inconstants.

Il était donc logique d'essayer d'appliquer la technique de l'immuno-fluorescence mise au point par COONS, au diagnostic bactériologique de cette maladie.

Après un bref rappel de l'historique, des principes, de la technique et des applications de l'immuno-fluorescence, nous analysons les travaux déjà effectués dans le domaine du diagnostic bactériologique de la coqueluche. Nous rapportons ensuite nos travaux personnels sur ce sujet et sur celui du diagnostic sérologique de la maladie.

L'IMMUNO FLUORESCENCE

I.- HISTORIQUE

C'est COONS qui mit au point et utilise le premier, en 1941, la technique de l'immuno-fluorescence. Il montra, en effet, qu'il était possible de marquer les molécules de globulines-anticorps avec un fluorochrome sans en altérer la réactivité immunologique. Ces anticorps, ainsi conjugués restent en effet capables de se fixer spécifiquement sur les antigènes correspondants et leur fluorescence permet ainsi de visualiser les immun-complexes en microscopie ultra-violette. COONS put ainsi observer des pneumocoques de type III rendus fluorescents par un contact avec une solution de globulines-anticorps homologues conjuguées avec de l'isocyanate de fluoresceine et provenant d'un sérum de lapin hyperimmunisé.

Cette élégante méthode fut ultérieurement perfectionnée et largement utilisée en immunologie et en microbiologie; d'abord dans le domaine de la recherche fondamentale et plus récemment dans celui du diagnostic en pathologie médicale.

II.- PRINCIPE DES DIFFERENTES METHODES

D' IMMUNO - FLUORESCENCE

1° - LA METHODE DIRECTE

Cette méthode fut, comme nous venons de le voir, la première utilisée par COONS.

Elle consiste à mettre en contact d'une préparation antigénique fixée sur une lame, la solution d'anticorps homologues conjugués avec un fluorochrome. Ces anticorps vont se fixer, se concentrer sur les antigènes. Leur excès non fixé sera

éliminé par lavage. La préparation est ensuite examinée avec un microscope éclairé par une source de rayons de longueur d'onde choisie pour exciter la fluorescence du fluorochrome marqueur. Le complexe antigène-anticorps est alors rendu visible par la fluorescence de ce dernier.

Si la préparation est constituée, par exemple, par un étalement de culture de bactéries, celles-ci apparaîtront fluorescentes à leur périphérie en raison de la concentration des molécules de globulines-anticorps fluorescentes sur les sites antigéniques de la surface bactérienne.

Si la préparation est constituée par des cellules parasitées par un virus, on pourra observer une fluorescence du cytoplasme (ou des noyaux) de ces cellules, en raison de la fixation sur les antigènes viraux intra-cellulaires des anticorps fluorescents homologues.

Cette méthode est utilisée d'un point de vue diagnostique pour rechercher les micro-organismes dans les produits pathologiques en utilisant des anticorps fluorescents de spécificité connue. Le micro-organisme visualisé est du même coup identifié. La technique associée, en effet, la vision rapide et directe de l'examen microscopique, à la spécificité immunologique.

2° - LA METHODE INDIRECTE

est basée sur le principe du test de COOMBS.

Dans un premier temps, au contact de la préparation antigénique fixée sur lame, est placé un sérum non conjugué. Si celui-ci contient des anticorps homologues, ils se fixent spécifiquement sur les antigènes correspondants. L'excès non fixé est éliminé par lavage.

Dans un deuxième temps, est mis en contact une solution d'anticorps conjugués, anti-gamme-globulines de l'espèce qui a fourni le sérum précédent.

Ces anticorps fluorescents vont alors se fixer sur les globulines - anticorps de la couche précédente et visualiser ainsi le complexe antigène-anticorps.

Cette méthode indirecte permet d'identifier un antigène si les anticorps homologues de l'anti-sérum de la première couche sont connus. Elle présente alors l'avantage sur la méthode directe de n'utiliser qu'un seul conjugué pour identifier plusieurs variétés d'antigènes.

Meis surtout elle permet d'identifier un anticorps si l'antigène homologue est connu. A ce titre, elle peut être utilisée comme méthode de diagnostic sérologique en pathologie humaine.

La couche intermédiaire est alors constituée par le sérum du malade supposé contenir les anticorps à identifier. La méthode peut être rendue quantitative en utilisant plusieurs dilutions de ce sérum.

3° - LA METHODE ANTI - COMPLEMENTAIRE

(GOLDWASSER et SHEPARD) utilise une solution d'anticorps conjugués anti-complément de cobaye capable de visualiser les immun-complexes sur lesquels on a fixé le complément de cobaye.

Cette méthode a été assez peu employée.

4° - LA METHODE D'INHIBITION DE LA FLUORESCENCE

a été proposée par GOLDMAN.

L'anticorps à identifier est mis au contact de l'antigène. S'il s'y fixe spécifiquement, il empêche la fixation d'un anticorps conjugué spécifique de cet antigène, mis au contact dans un second temps.

III. - MODALITÉS TECHNIQUES ET MATÉRIEL UTILISÉ

1. - LA PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'ANTICORPS CONJUGUÉS

peut être ainsi schématisée :

- Les premières opérations sont les suivantes :

- . Hyperimmunisation d'animaux.
- . Recueil et titrage du sérum : un titre élevé d'anticorps est indispensable.
- . Fractionnement de cet immun-sérum, par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, suivi de dialyse.
- . On obtient une solution de globulines dont le titre pondéral est déterminé par dosage d'azote.

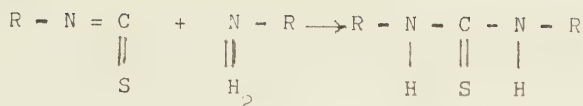
- Conjugaison :

- . Les fluorochromes utilisés sont des dérivés chimiques de fluorochromes courants, capables de se lier aux radicaux aminés des acides aminés des globulines.

C'est l'ISOCYANATE DE FLUORESCEINE qui a été le premier fluorochrome utilisé.

Actuellement, depuis les travaux de RIGGS, on a surtout recours à l'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE, plus stable que le précédent.

Il se combine vraisemblablement aux radicaux aminés des protéines par son groupement ISOTHIO
(- N = C = S) :



La fluorescence des dérivés de la fluorescéine excitée par les rayons violets - ultra-violets est de couleur jaune-verdâtre et d'intensité maximale à la longueur d'onde de 550 millimicrons.

D'autres fluorochromes peuvent être utilisés :

La LISSAMINE-RHODAMINE qui émet une fluorescence rouge-orangée (640 millimicrons).

Le DIMETHYLAMINONAPHTALENE - 5 - SULPHONIQUE ACIDE qui émet une fluorescence jaune-verdâtre comme la fluorescéine.

- La conjugaison se fait par agitation prolongée à froid du mélange globulines-fluorochrome dans des conditions de température, de pH et dans des proportions bien déterminées. Le poids de fluorochrome à incorporer, en particulier, est fonction du poids de globulines à marquer (Le rapport habituel est de 1 sur 20 pour l'isothiocyanate).

La solution de globulines conjuguées est ensuite dialysée ou gel-filtrée (sur SEPHADEX) pour éliminer le fluorochrome non fixé.

De nombreuses vérifications de ce conjugué doivent ensuite être effectuées :

- = Vérification de la proportionnalité moléculaire du marquage. (Rapport fluorochrome/protéines).
- = Vérification des propriétés immunologiques par les procédés sérologiques classiques et par immuno-fluorescence.

Les réactions croisées doivent être systématiquement recherchées et être éliminées dans la mesure du possible par des techniques d'épuisement.

Le conjugué est ensuite réparti et stocké au congélateur.

2° - PREPARATION DES LAMES

Quand il s'agit d'un prélèvement microbiologique (prélèvement de gorge, d'exsudats divers, de selles, ou de culture microbienne), l'étalement sur lame doit être mince et homogène.

En histologie, les coupes sont préparées congelées pour éviter l'altération des antigènes. En virologie, il s'agit le plus souvent de coupes de cultures cellulaires ou de tissus.

Les lames sont fixées par immersion dans un fixateur doux (alcool, acétone).

Ces préparations sont ensuite mises en contact avec la solution d'anticorps conjugués. Quelques gouttes en sont versées à cet effet sur la lame et laissées vingt minutes environ.

Un lavage par immersion dans l'eau physiologique (pH 7) élimine les anticorps non fixés.

Dans la méthode indirecte, la préparation est d'abord recouverte du sérum non conjugué, lavée, et recouverte dans un second temps du conjugué anti-globulines.

Les lames sont ensuite montées avec une goutte de glycérine tamponnée (p H 7 à 7,7) et une lamelle.

3° - L'EXAMEN MICROSCOPIQUE :

est effectué avec un microscope muni d'objectifs achromatiques ou apochromatiques.

On utilise généralement le fond noir.



L'éclaireage doit être intense et limité à la longueur d'onde excitatrice du fluorochrome, c'est-à-dire l'ultra-violet - bleu violet.

On utilise une lampe à vapeur de mercure. Un filtre " exciteur " placé devant elle et protégé par un filtre anticolorique, arrête le rayonnement inutile et ne laisse passer que les longueurs d'onde excitatrices.

Un deuxième filtre arrête au niveau de l'objectif ces rayons et ne laisse passer que les longueurs d'onde de la fluorescence.

IV.- LES APPLICATIONS DE L'IMMUNO - FLUORESCENCE

Elles sont trop nombreuses pour être toutes énumérées ici.

Cette technique a été très utilisée dans des travaux expérimentaux, en immunologie et en virologie essentiellement. Elle a contribué, par exemple, à l'étude de la formation des anticorps, du devenir des antigènes, des maladies à auto - anticorps, de la localisation cellulaire des antigènes viraux.

Dans ses applications diagnostiques, c'est essentiellement dans le domaine des maladies infectieuses qu'elle a été utilisée :

La méthode indirecte a été utilisée comme méthode de diagnostic sérologique dans la syphilis (DEACON, 1957), les pneumonies atypiques dues au mycoplasme d'EATON (COOK, 1960), la toxoplasmose (GOLDMAN, 1962).

La méthode directe a été utilisée pour le diagnostic virologique de la rage (GOLDWASSER, 1958) et pour le diagnostic bactériologique de nombreuses infections; essentiellement :

- Les gastro-entérites infantiles à colibacilles entéropathogènes (WHITAKER, 1958);

- = La diphtérie (WHITAKER, 1961 - MOODY, 1963),
- = Les infections streptococciques (MOODY, 1958),
- = La blennorragie (DEACON, 1959).

V.- DIFFICULTÉS DE LA MÉTHODE

Ces applications de la méthode d'immunofluorescence sont de valeur inégale; certaines tentatives se sont même soldées par des échecs (Salmonelles; Shigelles ; vibrions cholériques). Les expérimentateurs se sont en effet souvent heurté à des difficultés :

1° - DIFFICULTES D'ORDRE IMMUNOLOGIQUE :

L'immunofluorescence a les avantages de la spécificité immunologique mais elle en a aussi les limites. Des communautés antigéniques expliquent la possibilité de réactions croisées; par exemple communautés antigéniques entre les entérobactéries ou entre certains groupes de streptocoques (A - C - G). Les épuisements ne parviennent pas toujours à les éliminer. Il faut également compter avec la présence dans les sérums d'anticorps " naturels " anti-microbiens ou anti-tissulaires.

2° - DIFFICULTES DUES AUX FLUORESCENCES NON SPECIFIQUES

(non immunologiques) :

Les globulines légèrement dénaturées par le marquage ont tendance à se fixer de façon non spécifique sur diverses substances des préparations (exsudats, éléments cellulaires, etc ...).

L'utilisation de conjugués ayant un rapport de conjugaison optimal (MAC DEVITT - GOLDSTEIN) et les épuisements par poudres d'organe (COONS) ne suppriment pas complètement cet inconvénient.



Les autofluorescences (substances végétales) peuvent également être gênantes.

3.- DIFFICULTES TECHNIQUES

Les solutions d'anticorps conjugués et les préparations antigéniques utilisées ne sont pas standardisées. Leurs normes sont variables. La reproductivité de la méthode n'est ainsi pas parfaite.

Les échelles d'intensité de la fluorescence adoptées sont arbitraires.

Le rendement de la méthode, (surtout la méthode indirecte plus longue à pratiquer) n'est pas excellent.

Au total, on peut dire que si la rapidité et la sensibilité de l'immunofluorescence sont bonnes, sa spécificité et sa reproductibilité sont très irrégulières, selon les cas.

Nous avons cherché à étudier dans cette thèse quelle était la valeur de cette technique pour le diagnostic de la coqueluche, par l'analyse des travaux déjà rapportés et par une expérimentation personnelle.

APPLICATIONS DE L'IMMUNO FLUORESCENCE

AU

DIAGNOSTIC DE LA COQUELUCHE

I.- ANALYSE DES TRAVAUX PUBLIÉS

1° - Ce sont deux bactériologistes canadiens, DE REPENTIGNY et FRAPPIER, qui ont, les premiers, en 1956, utilisé une solution d'anticorps fluorescents vis-à-vis du bacille de BORDET-GENGOU (BORDETELLA PERTUSSIS), non dans un but diagnostique, mais pour étudier la localisation des antigènes de surface de cette bactérie.

2° - Les premières applications de la méthode du diagnostic de la maladie ont été publiées par DONALDSON et WHITAKER, puis par WHITAKER, DONALDSON et NELSON en 1960.

Les auteurs ont utilisé une solution d'anticorps conjugués à l'isothiocyanate de fluoresceine provenant de lapins hyperimmunisés, absorbée sur une résine échangeuse d'ions et épuisée par une suspension de staphylocoques.

Ce conjugué dilué au 1/10 était mis au contact d'étalements de prélèvements pharyngés (effectués par la méthode de BRADFORD : écouvillon souple pernasal) fixés sur lames par l'acétone.

Les prélèvements provenaient :

- de 128 malades ayant une " coqueluche clinique ".
- de 36 enfants en bonne santé (contrôle).
- de 86 enfants présentant des infections respiratoires non coquelucheuses (contrôle).

Les résultats furent les suivants :

- 78 % de résultats positifs parmi les 128 coquelucheux (100 sur 128)
- 2,3 % de résultats positifs parmi les 86 infections respiratoires non coquelucheuses (2 sur 86)

- Aucune fluorescence positive parmi les 36 enfants normaux.

Dans le groupe des coquelucheux, s'il était tenu compte de la durée d'évolution et du traitement antibiotique, les résultats se répartissaient ainsi :

- 94 % de résultats positifs chez les malades non traités, toussant depuis moins de trois semaines.
- 57 % de résultats positifs chez les malades non traités, toussant depuis plus de trois semaines.
- 11 % de résultats positifs chez les malades ayant reçu des antibiotiques pendant plus de 48 heures.

Les auteurs concluent que l'immuno-fluorescence est une méthode valable de diagnostic de la coqueluche.

3° - En 1961, KENDRICK, ELDERING et EVELAND comparèrent les résultats de la culture et de l'immuno-fluorescence.

Les prélèvements étaient effectués en milieu hospitalier par la méthode de BRADFORD.

Les écouvillons étaient transportés au laboratoire dans un milieu liquide. Après ensemencement du milieu de BORDET-GENGOU, l'écouvillon servait à faire un étalement sur lame.

La solution d'anticorps utilisée provenait de sérums de lapins hyperimmunisés avec une souche B. PERTUSSIS connue pour avoir peu de facteurs antigéniques communs avec PARAPERTUSSIS et BRONCHISEPTICA, et fut conjuguée à l'isothiocyanate de fluoresceine.

Les résultats obtenus sur 130 prélèvements furent les suivants :

- Résultats positifs par les deux méthodes	21
- Résultats négatifs par les deux méthodes	98
- Cultures + et fluorescence -	4
- Culture - et fluorescence +	7

Dans ce dernier groupe de sept résultats positifs par immuno-fluorescence seule, deux enfants seulement présentaient une coqueluche indiscutable.

Plusieurs conjugués, provenant de lapins différents, avaient été préparés. Certains donnaient une réaction croisée avec les staphylocoques; d'autres n'en donnaient pas.

4° - J. MARIE, F. HERZOG, et M. GAIFFE en 1962 ont rapporté leurs cent premiers résultats obtenus par immunofluorescence directe sur prélèvements pharyngés comparativement à la culture sur milieu de BORDET-GENGOU.

Les prélèvements pharyngés ont été effectués à l'aide d'une sonde de caoutchouc pernasale montée sur ~~seringue~~ seringue.

La solution de globulines utilisée provenait de sérums de lapin hyperimmunisés et était conjuguée à l'isothiocyanate de fluoresceïne. Elle avait été épuisée par une suspension de staphylocoques pour éliminer une réaction croisée avec ce germe.

Les résultats obtenus furent les suivants :

- Dans 55 cas de coqueluche :

l'immuno-fluorescence fut 45 fois positive (81 %)
et la culture 37 fois (67 %)

- Dans 45 cas d'affections non coquelucheuses,

l'immuno-fluorescence fut une fois positive.

Les auteurs ont également classé leurs résultats d'après la période de la maladie :

- 17 fluorescences + sur 17 prélèvements
en période catarrhale;
- 14 + sur 14 pendant la première semaine de quintes;
- 14 + sur 24 après la première semaine de quintes.

(15 de ces cas étaient traités par les antibiotiques
depuis plus de 48 heures).

Les auteurs concluent que cette méthode, en dépit
de son maniement délicat, peut être d'un grand secours pour le
clinicien, puisqu'elle permet un diagnostic sûr et précis, en
moins d'une heure, à la période catarrhale de la coqueluche.

II.- TRAVAUX PERSONNELS

Ces travaux préliminaires ont eu pour but d'étudier successivement deux procédés d'application de l'immuno-fluorescence au diagnostic de la coqueluche et de juger de leur valeur, avant une utilisation plus large.

Nous avons d'abord employé la méthode qui cherche à mettre en évidence par immuno-fluorescence directe les bacilles de BORDET-GENGOU dans les prélèvements pharyngés d'enfants suspects ou atteints de coqueluche. C' est celle qui a déjà été expérimentée par les trois auteurs dont nous avons résumé les travaux. Nous comparons nos résultats avec ceux qu'ils ont obtenus, puis nous discutons de l'intérêt de cette méthode, mais également de ses limites.

Nous avons ensuite expérimenté une méthode de diagnostic sérologique de la coqueluche utilisant l'immuno-fluorescence indirecte. Nous rapportons les premiers résultats obtenus et nous en discutons l'intérêt.

0.- EXAMEN DES PRELEVEMENTS DE GORGE
PAR IMMUNO-FLUORESCENCE DIRECTE

A.- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.- PREPARATION DE LA SOLUTION D'ANTICORPS CONJUGUES -
CONTROLES EFFECTUES

Nous avons hyperimmunisé un lapin à l'aide d'une suspension de BORDETELLA PERTUSSIS en phase I, tués par la chaleur (une heure à 56°). (+)

Cette suspension titrait 30 milliards de germes par centimètre cube.

L'animal a reçu dix injections intra-veineuses à une semaine d'intervalle. Les doses injectées ont été les suivantes : 0,5 - 1 - 1,5 - 1,5 - 1,8 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 ml.

Il a été saigné à blanc. Après coagulation du sang, le sérum a été prélevé stérilement.

Cet immun-sérum (25 ml.) a ensuite été fractionné par dilargage avec du sulfate d'ammonium à demi-saturation ajusté à pH 7. Cette opération a été effectuée par mélange à froid (0°) dans un agitateur magnétique. Le précipité obtenu a été centrifugé; puis le culot a encore été lavé deux fois avec du sulfate d'ammonium à demi-saturation, avant d'être dissous dans de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,1 (15 ml.).

Cette solution de globulines a ensuite été dialysée jusqu'à élimination du sulfate d'ammonium.

(+) - Nous remercions le Docteur CHEVE, de l'Institut PASTEUR, qui nous a communiqué cette souche.

La teneur en azote de la solution dialysée (20 ml.) a été mesurée par la méthode du biuret. Il en a été déduit la quantité pondérale de globulines.

La solution de globulines-anticorps a ensuite été conjuguée à l'isothiocyanate de fluoresceine (PROLABO).

Ce fluorochrome n'est soluble qu'en milieu alcalin. La solution de globulines (à 1 %) à laquelle il va être incorporé doit donc être tamponnée à pH 9,0 par un tampon carbonate (CO_3Na_2 : 13,25 g. pour 250 ml d'eau distillée, à mélanger à raison de 1 volume pour 8 volumes de CO_3NaH : 10,50 g. pour 250 ml d'eau distillée).

D'autre part, la proportion pondérale optimale d'isothiocyanate de fluoresceine par rapport aux globulines doit être de 1 sur 20.

Les proportions du mélange doivent donc finalement être les suivantes :

- Solution de globulines	1 % poids/volume
Tampon carbonate	15 % volume/volume
Eau physiologique	QS en volume
	pour obtenir la concentration
	finale en globulines de 1 %
Isothiocyanate de fluoresceine	1/20 du poids de globulines.

Notre solution de globulines après dialyse titrait 46,40 mg par ml, soit pour les 20 ml dont nous disposions : 928 mg de protéine.

Les proportions du mélange ont donc été les suivantes :

- Solution de globulines	928 mg =	20 ml.
Tampon carbonate		13,92 ml.
Eau physiologique tamponnée		58,88 ml.
Total en volume :		92,80 ml.
Isothiocyanate de fluoresceine	46,4 mg.	



La conjugaison est assurée par simple agitation prolongée du mélange, à froid pour éviter l'altération des globulines.

En pratique, nous avons d'abord mélangé dans un bécher : l'eau physiologique, le tampon, puis la solution de globulines. Nous avons incorporé ensuite très progressivement la poudre d'isothiocyanate de fluoresceine.

Le bécher était entouré de glace fondante. Le mélange était assuré par un agitateur magnétique.

L'agitation a été poursuivie 24 heures dans une chambre froide à + 4°.

La solution d'anticorps conjugués a ensuite été dialysée pour éliminer le fluorochrome en excès, non conjugué aux globulines. Cette dialyse a été effectuée en tube de cellophane contre de l'eau physiologique tamponnée à pH 7 par un tampon phosphate :

Cl Na	80 g.
Na H ₂ PO ₄	13,8 g.
Na OH (40 %)	7 ml.
Eau distillée QSP	10 litres ...

en chambre froide à + 4°, en assurant en permanence l'agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. L'eau de dialyse a été renouvelée deux fois par jour jusqu'à ce qu'elle ne soit plus teintée par la fluoresceine. Ce résultat a été obtenu après huit jours de dialyse.

Ultérieurement, une partie de ce conjugué a été passée sur une colonne de Sephadex G.25 pour éliminer ce qui pouvait rester de fluorochrome en excès non conjugué après la dialyse. Un excès de fluoresceine libre fut ainsi effectivement éliminé. Mais après cette gel-filtration, le conjugué, déjà un peu dilué après la dialyse, se trouve de nouveau dilué cinq fois.

Enfin, une faible partie de ce conjugué dialysé et gel-filtré, fut épuisé par une poudre de foie humain selon la technique décrite par CQONS.



- Finalement, nous disposions de trois solutions d'anticorps conjugués :

- . un conjugué simplement dialysé (N° 1),
- . un conjugué dialysé puis gel-filtré (N°2)
- . un conjugué dialysé, gel-filtré puis épuisé par une poudre d'organe (N° 3)

Ces trois conjugués ont été conservés dans un congélateur (-20°) après avoir été répartis dans des tubes à hémolyse fermés par un bouchon de caoutchouc.

- Nous avons effectué des contrôles des propriétés physiques et immunologiques de ces trois conjugués :

1° - Contrôle de la conjugaison, c'est-à-dire du nombre de molécules d'isothiocyanate de fluoresceine fixées sur chaque molécule de globuline.

Ce contrôle a été établi en dosant, d'une part l'azote de chacun des trois conjugués, ce qui permet d'en déduire le poids de globulines par ml; puis en dosant, d'autre part, la fluoresceine de ces mêmes conjugués.

La première mesure a été effectuée par la méthode de KJELDAHL et la seconde mesure au Spectrophotomètre (avec comme étalon de la fluoresceine cristallisée strictement anhydre). Les chiffres obtenus permettent, connaissant le poids moléculaire de la fluoresceine (376) et des globulines (160.000), d'établir le rapport moléculaire Fluoresceine - Protéine ($\frac{F}{P}$)

Les résultats obtenus ont été les suivants :

- Conjugué N° 1 :

= Protéines : 5,78 mg/ml.

= Fluoresceine : 103 μ g/ml

$$\begin{aligned}\text{Soit } \frac{F}{P} &= \frac{103}{5,786} \\ &= \frac{7,6}{1 \text{ mol.}}\end{aligned}$$

Remarque

Le poids de protéine est plus faible que celui de la solution à 1/100 conjuguée (10 mg/ml) en raison d'une légère précipitation et d'une dilution dans le tube de dialyse.

- Conjugué N° 2 :

= Protéines : 1,09 mg/ml

= Fluorescéine : 16,7 μ /ml

$$\text{soit } \frac{F}{P} = \frac{16,7}{1090}$$

$$= \frac{6,5 \text{ mol.}}{1 \text{ mol.}}$$

Remarques

Le poids environ cinq fois inférieur de protéines par rapport au conjugué N° 1 est dû à la dilution (cinq fois) consécutive à la gel-filtration sur Séphadex.

La proportion du marquage supérieure du conjugué N° 1 par rapport au conjugué N° 2 doit être en fait surestimée en raison de l'excès de fluorochrome libre contenu dans le premier et éliminé dans le second.

- Conjugué N° 3 :

= Protéines : 1,62 mg/ml

= Fluoresceine : 12,7 μ /ml.

$$\text{soit } \frac{F}{P} = \frac{12,7}{1090}$$

$$= \frac{4,95 \text{ mol.}}{1 \text{ mol.}}$$

Remarques

La dilution après Sephadex explique le poids de protéines plus faible que celui du conjugué N° 1.

Cependant, le poids est légèrement supérieur à celui du conjugué N° 2, sans doute en raison d'un résidu d'acides aminés provenant de la poudre de foie.

C'est pourquoi le rapport $\frac{F}{P}$ a été calculé en prenant le chiffre du conjugué N° 2 (1,09).

2° - Contrôle du titre en agglutinines

Les trois conjugués furent testés par agglutination avec une suspension de BORDETELLA PERTUSSIS en phase I titrant 10 milliards de germes par ml, à des dilutions du 1/20 au 1/160.000, en utilisant la méthode lente (24 heures d'étuve).

Les titres limites obtenus furent les suivants :

-	$\frac{1}{10.000}$	pour le conjugué N° 1
-	$\frac{1}{2.500}$	pour les conjugués N° 2 et 3

Les titres sont inférieurs pour ces deux derniers conjugués, en raison de leur dilution après gel-filtration (1/5)

3° - Contrôle immunologique en immuno-fluorescence

Les trois sérums conjugués furent testés en immuno-fluorescence à des dilutions du 20° au 160°, compte tenu

de la dilution au 1/5 des sérums conjugués N° 2 et N° 3 par rapport au N° 1, vis à vis de préparations de culture de BORDETELLA PERTUSSIS (phase I) et de plusieurs autres bactéries.

Les résultats furent les suivants, identiques pour les trois conjugués :

- BORDETELLA PERTUSSIS :

- . Dilution limite où la fluorescence est encore visible : 1/160° (1/32 pour 2 et 3)
- . Dilution où la fluorescence est encore maximale : 1/40° (1/8 pour 2 et 3)

- BORDETELLA PARAPERTUSSIS

Résultats identiques pour les mêmes dilutions.

- FERRYELLA BRONCHISEPTICA

Résultats identiques pour les mêmes dilutions.

- HEMOPHILUS INFLUENZAE

Pas de fluorescence.

- HEMOPHILUS PARA-INFLUENZAE

Pas de fluorescence

- STAPHYLOCOQUE DORE

Pas de fluorescence

- STREPTOCOQUE A

Pas de fluorescence



- STREPTOCOQUE A

Pas de fluorescence

- KLEBSIELLA OXYTOCA

Pas de fluorescence

- ESCHERICHIA COLI (O. 111 - B.4)

Pas de fluorescence

- SALMONELLA (NEWPORT)

Pas de fluorescence.

Ainsi nos trois sérums conjugués permettaient de détecter avec une bonne sensibilité le bacille de BORDET-GENGOU, mais leur spécificité était limitée par l'existence de réactions croisées pour les mêmes dilutions, avec BORDETELLA PARAPERTUSSIS et avec FERRYELLA BRONCHISEPTICA.

Par contre, aucune réaction croisée n'a été constatée avec le staphylocoque, contrairement à ce qu'ont déjà observé les trois auteurs analysés plus haut.

Enfin, les trois sérums conjugués furent testés sur quelques frottis de prélèvements de gorge de coquelucheux. Les fluorescence non spécifiques (mucus, éléments cellulaires) nous ont paru légèrement moins intenses avec le conjugué N°2 (passé sur Sc-phodex) qu'avec le conjugué N°1 (simplement dialysé).

Par contre, nous n'avons pas observé de différence entre le conjugué N°2 et le conjugué N°3 (épuisé par poudre de foie).

- Finalement, après tous ces contrôles, nous avons choisi d'utiliser le conjugué N°2 pour la suite de notre travail.

Résumons en les propriétés.

- = Solution de globulines provenant d'un sérum de lapin hyperimmunisé avec BORDETELLA PERTUSSIS (phase I).
- = Taux de concentration 1 pour mille environ (1,09 mg de protéine par ml.)
- = Conjuguée avec l'isothiocyanate de fluoresceine avec un rapport $\frac{F}{P}$ de $\frac{6,5}{1}$; dialysée et gel-filtrée
- = dont le titre en agglutinines est de 1/2.500
- = dont la fluorescence optimale avec les bacilles de BORDET GENGOU s'observe jusqu'à une dilution de 1/8 environ (ce qui équivaut au 1/40 observé avec le conjugué N° 1, cinq fois plus concentré).
- = qui manifeste une réaction croisée avec BORDETELLA PARAPERTISSOS et FERRYELLA BRONCHISEPTICA.

2.- MATERIEL OPTIQUE UTILISÉ

Nous avons utilisé un microscope LEITZ (ORTHOLUX) avec condensateur à fond noir et objectifs à diaphragme (l'objectif à sec X 63 a surtout été utilisé = grossissement 504). L'éclairage était assuré par une lampe à vapeur de mercure OSRAM-HB0-200. Le filtre exciteur utilisé était le filtre BG-12.

.- PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements pharyngés ont été effectués chez des enfants (le plus souvent des nourrissons) hospitalisés à l'Hôpital CLAUDE BERNARD et à l'Hôpital TROUSSEAU à PARIS. (Pr.BASTIN - Pr.LAPLANE)

Ces enfants étaient :

- soit atteints de coqueluche.

Les prélèvements ont été effectués dans ces cas après une durée variable d'évolution de la maladie.

- soit " douteux de coqueluche ".

Nous avons utilisé pour ces prélèvements la technique de BRADFORD qui consiste à introduire par la narine un écouvillon de coton cardé stérile monté sur un fil souple que l'on pousse à travers les fosses nasales jusqu'au dans le cavum, au contact de la paroi pharyngée postérieure.

L'écouvillon est laissé en place une minute environ. Il est préférable que l'enfant présente un accès de toux pendant ce temps; accès que l'on peut chercher à déclencher par pression du larynx.

A l'aide de cet écouvillon, nous pratiquions ensuite des frottis sur lames. Ces frottis doivent être très minces et bien étalés; les lames peu épaisses et bien propres.

Après avoir laissé sécher ces frottis, nous les fixions par immersion des lames pendant dix minutes dans une petite cuve contenant de l'acétone anhydre.

Les lames étaient ensuite séchées. Elles étaient examinées soit le jour même, soit les jours suivants. Dans ce cas, elles étaient conservées dans un réfrigérateur (+ 4°) jusqu'à l'examen.

4.- METHODES D'EXAMEN

A chaque séance d'examen de prélèvements, un tube de solution d'anticorps conjugués était décongelé puis dilué au 1/4.

Cette dilution était suffisante car notre conjugué, comme nous l'avons dit, était déjà dilué par la dialyse et la gel-filtration et ne titrait que un pour mille de protéines après ces opérations.

La fluorescence maximale au cours des tests préliminaires, rappelons-le, s'observait avec BQRDETELLA PERTUSSIS jusqu'à la dilution de 1/8.

- Deux à trois gouttes de conjugué étaient ensuite déposées à la pipette PASTEUR au centre des frottis sur lame (cercle par un trait au diamant).

Le contact était maintenu vingt minutes.

Pour éviter l'évaporation de la solution d'anticorps conjugués, les lames étaient placées pendant ce temps sous une boîte en plastique retournée, près d'un coton imbibé d'eau.

Après ces vingt minutes de contact, les lames étaient lavées de façon à éliminer l'excès d'anticorps conjugués non fixés sur les antigènes bactériens. Ce lavage était effectué avec de l'eau physiologique (à pH : 7) d'abord par rinçage doux puis par immersion des lames dans une petite cuve pendant dix minutes. L'eau de la cuve était renouvelée au bout de cinq minutes.

Les lames étaient ensuite épongées autour de l'étalement, à l'aide d'une compresse.

Puis une goutte de glycérine tamponnée à pH 7,7 par un tampon phosphate (l'excitation de la fluorescence est optimale pour un pH légèrement alcalin) était déposée au centre de la préparation et recouverte d'une lamelle.

Les lames étaient alors prêtes pour l'examen microscopique.

- En plus des lames de prélèvements de gorge, une lame-témoin de frottis de suspension de BORDETELLA PERTUSSIS de culture était également systématiquement préparée à chaque séance.

- L'examen microscopique était effectué en chambre noire avec l'appareillage optique déjà décrit.

Nous avons toujours utilisé le condensateur à fond noir. Une goutte d'huile LEITZ (non spontanément fluorescente) était placée entre celui-ci et la lame.

Nous avons le plus souvent utilisé l'objectif à sec LEITZ X 63 qui permettait d'examiner assez rapidement la totalité de la lame, tout en offrant un grossissement suffisant (504).

Souvent la lecture s'est avérée difficile pour plusieurs raisons :

- importance d'éléments manifestant une fluorescence non spécifique : Mucus nasal surtout si le frottis est trop épais; éléments cellulaires en particulier leucocytes dont le cytoplasme était souvent fluorescent; débris végétaux, en particulier débris provenant de soupe de carottes chez les nourrissons vomisseurs.
- rareté des éléments coccobacillaires fluorescents.
- altération de la morphologie de ces éléments qui étaient parfois empâtés, déformés.

Dans ces conditions, bien des prélèvements étaient simplement douteux; nous les avons notés systématiquement négatifs, pour éviter dans la mesure du possible des erreurs par excès.

Sur d'autres lames, au contraire, nous avons observé de nombreux éléments coco-bacillaires, manifestant une fluorescence aussi brillante que les B. PERTUSSIS de la lame témoin, bien dessinés, c'est-à-dire présentant de façon nette une périphérie fluorescente et un centre sombre, se détachant sur un fond bien propre. Ces éléments étaient soit isolés, soit le plus souvent groupés en amas de quatre ou cinq éléments ou plus réalisant un aspect de " micro-colonie ".

Dans ces conditions, ces lames furent notées positives, car malgré les réactions croisées signalées (B. PARA PERTUSSIS et F. BRONCHISEPTICA), il y avait une forte probabilité pour que les éléments coco-bacillaires observés soient des bacilles de BORDET et GENGOU.

D'autres lames enfin pouvaient être notées négatives sans hésitation, quand on ne rencontrait pas les difficultés signalées plus haut.

B. - RÉSULTATS DE 60 PRÉLÈVEMENTS

Ces soixante prélèvements ont été effectués par la méthode de BRADFORD chez des enfants - surtout des nourrissons - hospitalisés pour coqueluche ou pour suspicion de coqueluche.

Les dossiers de tous ces enfants ont été revus ultérieurement. Nous avons noté la confirmation ou l'infirmité du diagnostic pour les douteux, en nous basant sur l'apparition de quintes typiques et la durée de l'évolution.

Dans tous les cas de coqueluche, évidents au moment du prélèvement, ou confirmés ultérieurement, nous avons noté le délai séparant le prélèvement du début des quintes typiques.

Nous avons également noté les enfants qui avaient reçu un traitement antibiotique avant le prélèvement ...

Parmi les 60 enfants prélevés, 47 présentaient, au moment du prélèvement, ou présentèrent dans les jours suivants, des quintes typiques authentifiant cliniquement le diagnostic de coqueluche, sauf un enfant dont le diagnostic était simplement probable (contage évident par les frères et soeurs mais symptomatologie clinique atténuée).

Parmi ces 47 enfants coquelucheux, 18 eurent un prélèvement positif en immuno-fluorescence, d'après les critères énoncés plus haut.

On peut remarquer que, dans ces 18 cas, le prélèvement a été effectué le plus souvent à la période catarrhale ou dans la première semaine des quintes (13 fois sur 18) et le plus souvent chez des enfants n'ayant pas reçu d'antibiotiques (16 fois sur 18).

Au contraire, parmi les 29 cas négatifs, le prélèvement a été effectué treize fois après la première semaine de quintes et quinze fois chez des enfants ayant reçu des antibiotiques.

Les résultats de ces 47 prélèvements effectués chez des enfants coquelucheux sont consignés dans le tableau N° 1 (résultats positifs) et dans le tableau N° 2 (résultats négatifs).

Enfin, parmi les 60 enfants chez qui nous avons fait des prélèvements, 13 étaient " suspects " de coqueluche, mais n'ont finalement présenté aucun signe de la maladie. Dans cette série, consignée dans le tableau N° 3, nous n'avons observé aucun résultat positif.

Le tableau N° 4 récapitule tous nos résultats.

T A B L E A U N° 1

18 prélèvements positifs effectués chez des enfants coqueluchoux

N°	N O M	Age	Date prélèvement par rapport au début des quin - tes typiques .Avant - (Nb.jours) .Après + (" ")	Anti- biotiq. avant préle- vement	Résultat immuno- fluores. directe
1	DEL.. Murielle	7 mois	- 14	0	+
2	ROU.. Pascale	3 mois	- 6	0	+
3	ROU.. Patricia	3 ans	- 6	0	+
4	FER.. Florence	8 ans	- 3	0	+
5	COS.. Joëlle	1 an	+ 2	0	+
6	VAL.. Thierry	3 mois	+ 2	0	+
7	CHA.. Richard	2 mois	+ 2	0	+
8	REG.. Bernard	18 mois	+ 3	0	+
9	KOV.. Elisabeth	4 ans	+ 3	0	+
10	COU.. Didier	18 mois	+ 4	0	+
11	CHE.. Christine	14 mois	+ 6	0	+
12	LAV.. Isabelle	6 ans	+ 7	+	+
13	HAM.. Manuel	1 an	+ 8	48 h. 0	+
14	DJE.. Fatiha	4 mois	+ 11	0	+
15	BAH.. Salha	4 mois	+ 20	0	+
16	BES.. J.Claude	5 mois	+ 23	+	+
				3 j.	
17	MAR.. Léon	1 an	+ 27	0	+
18	CHE.. Brigitte	2 ans	Toux atypique Diagnostic probable	0	+

27	DJE.. Nora	10 mois	+	3	+	-
28	SER.. Angelina	22 mois	+	3	0	-
29	MAR.. Daniel	3 ans	+	4	0	-
30	BOU.. Patrioia	3 ans	+	4	+	-
31	HEU.. Didier	10 mois	+	5	0	-
32	DUD.. Alain	5 mois	+	5	+	-
33	BOU.. Dominique	4 mois	+	8	+	-
34	LOU.. Philippe	14 mois	+	8	+	-
35	CHE.. Françoise	3 mois	+	10	0	-
36	BLA.. Brigitte	6 mois	+	15	+	-
37	HEU.. Christine	3 mois	+	16	+	-
38	KHA.. Nouara	2 mois	+	16	0	-
39	CUN.. Patricia	8 mois	+	20	+	-
40	BLA.. Patrick	2 ans	+	21	+	-
41	AMB.. Rachid	20 mois	+	23	0	-
42	BON.. Michel	4 ans	+	26	+	-
43	ZOG.. Yasmina	6 mois	+	27	+	-
44	LAM.. Gilbert	6 mois	+	30	0	-
45	TER.. Patrick	10 mois	+	30	+	-
46	DUH.. Sylvie	4 mois	+	30	?	-
47	MAN.. Marc	10 mois	+	33	+	-

T A B L E A U N° 2

29 prélèvements néonataux, effectués chez des enfants coquelucheux

N°	N O M	Age	Date prélèvement par rapport au début des quinquennales typiques avant - (Nb jours) Après + (" ") venant	Anti- biotiques avant prélèvement	Résultat immuno- fluores? directe
19	BRI.. Corinne	14 mois	- 17	0	-
20	BRI.. Joelle	6 mois	- 7	+	-
21	ROU.. J. Pierre	20 mois	- 6	0	-
22	JIC.. Corinne	10 mois	- 1	+	-
23	VAC.. Georges	11 mois	+ 1	0	-
24	ABD.. Zakarja	10 mois	+ 2	0	-
25	AZI.. Farida	11 mois	+ 2	0	-
26	MON.. Félix	1 an	+ 3	0	-

T A B L E A U N° 3

13 prélèvements négatifs effectués chez des enfants atteints
de syndrome respiratoire non coquelucheux :

N°	N O M	A G E	Résultat immuno-fluo- rescence directe
48	TAH..Abdelfarid	1 mois	-
49	GAG.. Christine	5 mois	-
50	JUR.. Sylvain	1 an	-
51	AMB.. Marc	11 mois	-
52	AMB.. Sylvie	5 mois	-
53	VOG.. Jocelyne	4 mois	-
54	NEZ.. Yasmine	9 mois	-
55	ANC.. Sylvie	5 mois	-
56	PEN.. Patricia	2 ans	-
57	MES.. Christian	2 ans	-
58	GIL.. Joël	6 mois	-
59	BEN.. Nasseria	9 mois	-
60	BAH.. Malika	22 mois	-

T A B L E A U N ° 4

RESULTATS de la recherche de BORDETELLA PERTUSSIS par IMIUNO -
FLUORESCENCE DIRECTE sur 60 prélèvements pharyngés

60 PRELEVEMENTS effectués dans :	
47 cas de coqueluche	18 résultats positifs
	29 résultats négatifs
13 affections non - coquelucheuses	13 résultats négatifs

C.- DISCUSSION DES RÉSULTATS

Plusieurs remarques sont à faire à propos des résultats que nous avons obtenus :

- 1° - La proportion de résultats positifs que nous avons obtenue dans les cas de coqueluche est plus faible que celle rapportée par les auteurs qui ont déjà expérimenté la méthode.

Nous avons trouvé 18 résultats positifs dans 47 cas de coqueluche, soit 38,3 %.

Rappelons les résultats obtenus par les auteurs précités :

- WHITAKER, DONALDSON et NELSON ont rapporté.
78 % de résultats positifs dans les cas de coqueluches.
- J. MARIE, HERZOG et GAIFFE : 81 % de résultats positifs dans les cas de coqueluche.
- KENDRICK, ELDERING et EVELAND (28 résultats positifs sur 130 prélèvements) n'ont pas comparé tous leurs résultats au diagnostic clinique.

Nous pensons qu'il y a deux raisons au plus faible pourcentage que nous avons obtenu :

a.- Nous avons effectué les prélèvements chez des enfants hospitalisés, quelle que soit la période de leur maladie et qu'ils aient reçu ou non des antibiotiques. Ainsi beaucoup d'enfants de notre série ont été prélevés après la première semaine des quintes (certains très tardivement) ou après antibiothérapie.

Ces deux facteurs ont certainement contribué à abaisser la proportion de résultats positifs. D'ailleurs,

nous l'avons déjà signalé, nos 18 résultats positifs ont été presque tous observés chez les enfants non traités et prélevés au début de la maladie.

WHITAKER et coll. et J. MARIE et coll. ont également remarqué l'incidence de ces deux facteurs sur les résultats :

WHITAKER signale que le pourcentage de cas positifs chez les sujets atteints de coqueluche tombe à 57 % si la maladie évolue depuis plus de trois semaines et à 11 % si un traitement antibiotique a été administré pendant plus de 48 heures.

J. MARIE note également la diminution de la proportion de résultats positifs après la première semaine des quintes chez les enfants traités.

b.- L'autre raison nous paraît être la sévérité des critères de positivité que nous avons adoptés et qui ont été détaillés plus haut.

Nous n'avons considéré comme positives que les lames parfaitement lisibles. Les lames douteuses ont été notées systématiquement négatives.

Nous avons adopté ces critères pour tenter d'éviter dans la mesure du possible des erreurs par excès. Celles-ci nous ont, en effet, paru possibles sur les lames douteuses difficiles à lire en raison des fluorescences non spécifiques, de la rareté ou de la déformation des germes, que nous avons signalées.

Quelques erreurs par excès (prélèvements positifs en immuno-fluorescence chez des sujets non coquelucheux) ont d'ailleurs été rapportées par les auteurs précités.

C'est au début de notre série que nous avons eu le plus souvent des résultats négatifs. Nous pensons que ceci était dû à l'addition de deux raisons énoncées plus haut : beaucoup des enfants prélevés à ce moment avaient des coqueluches évoluées et traitées, beaucoup de lames

étaient difficiles à lire car les frottis de prélèvements étaient alors effectués trop épais.

- 2° - Nous devons faire une seconde remarque à propos des réactions croisées observées avec notre solution d'anticorps conjugués, au cours des tests préliminaires.

Nous n'avons observé ces réactions croisées qu'avec BORDETELLA PARAPERTUSSIS et FERRYELLA BRONCHISEPTICA. Aucune réaction croisée n'a été constatée avec les autres germes testés, en particulier ni avec les staphylocoques, ni avec les hémophiles.

Les auteurs précités ont noté les réactions croisées suivantes avec leur conjugué anti-BORDETELLA PERTUSSIS :

- WHITAKER

Réaction croisée :

- . forte avec les staphylocoques,
- . modérée avec Bronchiseptica,
- . absente avec Para-Pertussis.

- KENDRICK

Réaction croisée :

- . forte avec cocci gram positif en particulier Staphylocoques pour les sérums provenant de certains lapins seulement,
- . faible avec certaines souches de Bronchiseptica,
- . absente avec Para-Pertussis.

- J. MARIE

Réaction croisée :

- . possible avec Staphylocoques,
- . absente avec Para-Pertussis.

Les réactions croisées avec les cocci gram + et en particulier avec les staphylocoques ne se rencontrent donc qu'avec certains lapins. Les auteurs qui les ont rencontrées les ont éliminées par épuisement avec une suspension de staphylocoques

(WHITAKER, J. MARIE) ou en sélectionnant les sérums de lapins (KENDRICK).

Les réactions croisées avec PARA-PERTUSSIS et BRONCHISEPTICA s'expliquent par des communautés antigéniques entre ces espèces très voisines, communautés déjà connues et étudiées par les méthodes sérologiques classiques.

Elles sont en pratique assez peu gênantes, car B. PARAPERTUSSIS est pathogène (Paracoqueluches) et F. BRONCHISEPTICA se rencontre rarement chez l'homme.

Cependant, un certain degré d'approximation entache à ce point de vue la méthode d'immuno-fluorescence directe.

Il serait peut-être possible de l'éliminer par des épuisements.

Au total, il nous paraît possible, à la lumière des travaux analysés et de nos travaux personnels, de porter le jugement suivant sur la valeur de l'immuno-fluorescence directe pour le diagnostic bactériologique de la coqueluche :

- Cette méthode peut rendre de bons services pour le diagnostic de la coqueluche à condition d'effectuer les prélèvements au début de la maladie (c'est d'ailleurs à la période catarrhale que le diagnostic bactériologique est utile) et avant tout traitement antibiotique.

Sa qualité principale est sa rapidité.

Sa sensibilité a été également trouvée meilleure que la méthode classique de culture sur milieu de BORDET-GENGOU par les auteurs qui ont comparé les deux méthodes.

- Cependant, elle n'est pas exempte de quelques difficultés :

- Certains prélèvements sont difficiles à lire. Des erreurs par excès sont possibles, à notre avis, si des critères sévères de positivité ne sont pas adoptés. (Mais la sensibilité s'en trouve alors diminuée).

On peut chercher à diminuer ces difficultés de lecture, en apportant beaucoup de soins à la conjugaison de la solution d'anticorps utilisée. Ce sont, en effet, essentiellement les fluorescences non spécifiques du mucus et des éléments cellulaires du frottis qui sont gênantes. Elles semblent dues à une adsorption des globulines (légèrement dénaturée par la conjugaison) sur ces éléments. Or, MAC DEVITT (et coll.) et GOLDSTEIN (et coll.) ont montré que la proportionnalité moléculaire du marquage des globulines intervenait dans l'intensité de ces fluorescences non spécifiques.

Quand le rapport $\frac{F}{P}$ exprimant le nombre de molécules

d'isothiocyanate de fluoresceine fixées sur une molécule de globulines est trop grand, l'intensité des fluorescences non spécifiques augmente. Il ne doit cependant pas être trop faible pour ne pas diminuer trop la sensibilité du conjugué. Pour ces auteurs, le rapport optimal $\frac{F}{P}$ se situe aux environs de $\frac{2}{1}$.

Il semble donc que l'on ait intérêt à conjuguer les anticorps de façon à obtenir ce rapport de marquage.

Le conjugué que nous avons utilisé avait un rapport $\frac{F}{P} = \frac{6,5}{1}$. A ce point de vue, il était donc un peu " hyper-marqué ".

Nous chercherons à préparer et à utiliser ultérieurement à ces travaux préliminaires un conjugué se rapprochant des normes optimales définies plus haut.

- L'autre difficulté est due aux réactions croisées avec d'autres germes que nous avons signalées.

Ces réactions croisées souvent très gênantes (staphylocoques) devront être dépistées systématiquement avec tout nouveau conjugué utilisé, et éliminées dans la mesure du possible par épuisement ou sélection des sérums.

- En conclusion, cette méthode semble devoir être fort utile pour le diagnostic précoce de la coqueluche, à condition d'avoir l'habitude de son usage.

Malgré les précautions et contrôles indispensables dans la préparation des conjugués, dans la préparation et la lecture des lames, elle comporte un certain nombre de causes d'erreur qui lui confèrent un certain degré d'approximation.

D'une façon générale, d'ailleurs, les applications de l'immuno-fluorescence directe au diagnostic des infections bactériennes, en particulier sur prélèvements de gorge (streptococcies, diphtérie) n'ont pas la rigueur des procédés bactériologiques classiques.

2°.- METHODE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE LA COQUELUCHE PAR IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE

A.- PRINCIPES

Nous avons voulu explorer les possibilités d'application de l'immuno-fluorescence au diagnostic sérologique de la coqueluche. Pour mettre en évidence les anticorps anti-
PERTUSSIS dans le sérum des malades, il fallait utiliser l'immuno-fluorescence indirecte, basée sur le principe de COOMBS : Le sérum du malade sera placé (à différentes dilutions pour rendre la méthode quantitative) au contact d'une préparation de BORDETELLA PERTUSSIS.

Si ce sérum contient des anticorps spécifiques, ils doivent se fixer sur les antigènes bactériens. Ces anticorps fixés seront ensuite révélés, dans un deuxième temps, par une solution d'anticorps conjugués anti-gamma globulines humaines.

. - MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. - PREPARATION DE LA SOLUTION D'ANTICORPS CONJUGUÉS ANTI-GAMMA GLOBULINES HUMAINES - CONTROLES EFFECTUÉS

- Un lapin a été hyperimmunisé avec une solution à 3 mg/ml en eau physiologique (poids brut sous dessiccation préalable) de fraction II et III de COHN, précipitée par un volume égal d'alun à 2 %.

L'animal a reçu les doses suivantes en intra-veineuse, tous les deux jours : 0,5 - 0,5 - 0,5 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 ml ; puis 3 ml trois mois plus tard.

Il a été soigné une semaine après ce rappel.

Les 56 ml de sérum prélevés ont été fractionnés par 47 % de sulfate d'ammonium. Le culot repris dans 56 ml d'eau distillée a été de nouveau précipité par le sulfate d'ammonium à 47 %. De nouveau, le culot a été repris dans 56 ml d'eau physiologique tamponnée (pH 7,1).

Cette solution a été dialysée jusqu'à élimination du sulfate d'ammonium. Le volume après dialyse était de 67 ml. Le dosage d'azote a été effectué sur 1 ml. Il a révélé un poids de protéines de 18 mg. par ml, soit 1.188 mg (dans les 66 ml. restants) qui ont été dilués dans 117 ml. (eau physiologique tamponnée à pH 9,0 par tampon carbonate) de façon à obtenir une solution à 1 %. L'isothiocyanate de fluoresceine (PROLABO) a été incorporé à froid selon la technique indiquée au chapitre précédent pour la préparation du conjugué anti-BORDETELLA PERTUSSIS. Mais cette fois, l'isothiocyanate a été incorporé à la proportion pondérale de 1 sur 40 par rapport au poids de globulines, de façon

à obtenir une proportionnalité moléculaire de marquage proche de l'optimum défini plus haut $\left(\frac{2}{1}\right)$

Ont donc été incorporés 29,5 mg d'isothiocyanate de fluoresceine. L'excès non conjugué a été éliminé par gel - filtration sur une colonne de Sephadex G-25. Avec la variété utilisée (variété fine), le filtrage a été lent, mais la solution a été très peu diluée (126 ml.)

- La proportionnalité moléculaire de marquage a ensuite été vérifiée.

Du dosage d'azote (méthode de KJELDAHL) a été déduit le poids de globulines : 19,10 mg/ml. Le dosage de fluoresceine a été effectué au spectrophotomètre dans les conditions déjà décrites : 119 μ g/ml. Connaissant le poids moléculaire de la fluoresceine (376) et de globulines (160.000), il a été possible de calculer le rapport de marquage $\frac{F}{P}$. Il était de 2,65

molécules d'isothiocyanate de fluoresceine pour une molécule de globuline - anticorps (2.65), c'est-à-dire optimal d'après MAC DEVITT et GOLDSTEIN. 1

- Ce sérum conjugué a été titré par hémagglutination conditionnée (Benzidine diazotée) : les titres trouvés furent les suivants :

- . 3.600 avant conjugaison,
- . 1.800 après conjugaison.

- Il fut également testé en immuno-fluorescence directe vis à vis de BORDETELLA PERTUSSIS, c'est à dire en mettant en contact directement ce conjugué anti-gamma-globulines humaines avec un frottis de bacilles de BORDET GENGOU (phase I). Ce test révéla une difficulté inattendue : une fluorescence des bacilles modérée, mais suffisante pour fausser l'interprétation de la méthode indirecte.

- Cette fluorescence non spécifique put être éliminée par épuisement avec une suspension de BORDETELLA PERTUSSIS.

Nous avons procédé de la façon suivante :

Une partie du conjugué a été épuisée deux fois :

- Une fois : 2 heures à la température du laboratoire,
- Une fois : 18 heures à + 4°,

par une suspension de BORDETELLA PERTUSSIS (phase I) titrant 160 milliards de germes par ml, à raison de 2,5 ml de conjugué pour 4 ml de suspension à chaque fois.

- Au cours d'un nouveau contrôle, les bacilles de BORDET-GENGOU ne manifestèrent plus aucune fluorescence après contact avec le conjugué anti-humain ainsi épuisé.

- Seul, ce conjugué épuisé fut utilisé par la suite.

Il fut réparti et stocké au congélateur (-20°).

2.- PREPARATION DES FROTTIS DE BORDETELLA PERTUSSIS (antigènes)

Des frottis furent effectués sur des lames minces, dans un cercle tracé au diamant, avec une suspension de bacilles en phase I diluée de façon à ce qu'il y ait environ 50 germes par champ microscopique (au grossissement 500).

Ces frottis furent séchés puis fixés par immersion dans l'acétone anhydre pendant dix minutes.

Les lames étaient conservées au réfrigérateur (+ 4°). Nous n'avons pas constaté de diminution de l'antigénicité des préparations, même après plusieurs mois de conservation.

3.- PRELEVEMENT DES SÉRUMS EXAMINÉS

Des prélèvements de sang (2 à 5 ml.) furent effectués chez trente-deux enfants. Vingt parmi eux étaient hospitalisés pour coqueluche à la phase catarrhale (diagnostic confirmé par la suite) ou à la période des quintes après une durée d'évolution variable. Certains de ces enfants ont été prélevés deux fois.

Chez dix autres enfants hospitalisés pour des affections non coquelucheuses, des prélèvements furent effectués pour obtenir des sérums - témoins négatifs. Ces dix enfants n'avaient pas eu la coqueluche, mais trois d'entre eux avaient été vaccinés et deux d'entre eux avaient reçu des gamma-globulines.

Après coagulation, le sang était centrifugé et le sérum recueilli stérilement et réparti dans trois tubes à hémolyse. Ces sérums étaient ensuite conservés au congélateur (-20°) jusqu'à leur examen.

4.- METHODE D' EXAMEN

Les sérums examinés étaient dilués avec de l'eau physiologique au 1/10, 1/30, 1/90, 1/270 (ces dilutions ayant été choisies après des essais préliminaires).

Quelques gouttes de chacune de ces dilutions de sérum était ensuite mise au contact d'un frottis de bacilles de BORDET-GENGOU pendant vingt minutes (avec les précautions déjà signalées).

Les lames étaient ensuite lavées par rinçage doux puis par immersion dans un bac d'eau physiologique (pH : 7) pendant dix minutes (en renouvelant l'eau après cinq minutes). Puis elles étaient éponnées autour de la préparation.

Dans un deuxième temps, quelques gouttes de conjugué anti-humain préalablement dilué au 1/20 (dilution choisie après titrage de son activité en IF.) était mis au contact des frottis pendant encore vingt minutes.

Après un deuxième lavage effectué comme précédemment, les lames éponnées autour de la préparation étaient montées avec une goutte de glycérine tamponnée (pH : 7,7) et une lamelle.

L'examen microscopique était alors effectué avec le microscope à fluorescence LEITZ (lampe OSRAM HBO - 200 et filtre exciteur BG-12) en utilisant le condensateur à fond noir et l'objectif à sec X 63 (grossissement 504) comme pour la méthode directe.

Une échelle de notation de l'intensité de la fluorescence des bacilles fut adoptée :

- +++ : fluorescence très vivo,
- ++ : fluorescence moins intense mais encore
très bien visible.
- + : fluorescence modérée.
- 0 : fluorescence nulle ou à l'extrême limite de la
visibilité.

A chaque séance, nous examinions toujours un sérum négatif déjà connu comme tel et un conjugué direct (sans couche intermédiaire de sérum humain) qui tenaient lieu de témoins négatifs.

RÉSULTATS DE L' EXAMEN

DES SÉRUMS DE 32 ENFANTS (37 SÉRUMS)

Ces résultats sont consignés dans deux tableaux :

- Le tableau N° 5 récapitule les résultats sérologiques obtenus chez vingt enfants atteints de coqueluche.
- Le tableau N° 6 récapitule les résultats obtenus chez douze enfants non coquelucheux et n'ayant pas d'antécédents de cette maladie (témoins négatifs).

3	CHE.. Christine	14 mois	- 2	+	0	0	0	0
4	MAR.. Christine	7 ans	+ 4	+	+	+	0	0
5	KOU.. Elisabeth	4 ans	+ 3	++	0	0	0	0
			+ 21	++	+	0	0	0
6	AIC.. Messouda	4 mois	+ 4	0	0	0	0	0
7	COU.. Philippe	18 mois	+ 4	+	0	0	0	0
8	BOU.. Patricia	3 ans	+ 4	+++	++	++	0	0
9	COR.. Dominique	6 ans	+ 8	++	+	0	0	0
10	HEN.. Nicole	3 ans	+ 9	++	+	0	0	0
11	KTO.. André	2 ans	+ 11	+++	++	+	0	0
			+ 26	+++	+++	+++	+	+
12	NAT.. Sylvain	1 an	+ 13	+++	++	+	0	0
13	ROU.. Viviane	20 mois	+ 13	+++	++	+	0	0
14	TER.. Alain	4 ans	+ 15	+++	+++	++	0	0
15	SAI.. Farida	7 ans	+ 23	+++	+++	++	++	++
16	BAH.. Selha	4 mois	+ 27	+++	+++	++	0	0
17	JAM.. Dolorés	5 ans	+ 28	++	++	++	0	0
18	TEI.. Roselène	11 mois	+ 30	+++	+++	+	0	0
19	COC.. Didier	6 ans	+ 37	+++	++	+	0	0
20	ROU.. J. Paul	10 mois	+ 40	++	++	++	+	+

T A B L E A U N° 6

RESULTATS SEROLOGIQUES CHEZ 12 ENFANTS NON ATTEINTS DE COQUELUCHE ET N'AYANT AUCUN ANTECEDENT DE CETTE MALADIE :

N°	N O M	A G E	R E M A R Q U E S	FLUORESCENCE AVEC IES			
				DILUTIONS DE SERUM AU :			
				1/10	1/30	1/90	1/270
21	LEV., Alain	4 ans		0	0	0	0
22	BOU., Charles	6 mois		0	0	0	0
23	PAR., Sylviane	11 ans		0	0	0	0
24	TOU., Chantal	4 ans		0	0	0	0
25	MOS., Guy	3 ans		+	0	0	0
26	END., Alain	4 ans		+	0	0	0
27	TAN., Christian	5 ans		..+	0	0	0
28	TRO., François	16 mois	Vaccin 3 mois avant	+++	++	0	0
29	BIS., Alain	5 ans	Vaccin 2 ans avant	0	0	0	0
30	CLE., Marie Fr.	6 ans	Vaccin 3 mois avant	0	0	0	0
31	TAN., Michel	4 ans	Gamma-globulines 3 mois avant	++	+	0	0
32	CHA., Dominique	5 ans	Gamma-globulines 3 mois avant Gamma-globulines 3 mois 1/2 avant	++ 0	0 0	0 0	0 0

. - DISCUSSION DES RÉSULTATS

Dans le groupe des vingt enfants atteints de coqueluche, les sérums prélevés à partir du 8^{ème} jour de la période des quintes contiennent des anticorps anti-BORDETELLA PERTUSSIS décelables par immuno-fluorescence indirecte jusqu'à des titres de 1/30 ou 1/90, parfois 1/270.

Les sérums prélevés dans les trois jours précédant les quintes et dans la première semaine des quintes donnent des résultats variables selon les enfants. Un d'entre eux n'a pas d'anticorps décelables au quatrième jour des quintes à un titre de 1/10; un autre trois jours avant le début des quintes a déjà une réaction positive jusqu'au 1/90; les autres enfants ont des résultats intermédiaires.

- Dans le groupe des douze enfants témoins négatifs, aucune fluorescence ne fut constatée, ou seulement une fluorescence modérée au titre de 1/10.

Deux enfants cependant faisaient exception, car leur sérum était positif jusqu'au 1/30.

L'un d'entre eux avait été vacciné récemment contre la coqueluche; l'autre avait reçu des gamma-globulines trois semaines auparavant (sans autre précision).

- Après cette étude préliminaire, il paraît donc possible d'utiliser l'immuno-fluorescence indirecte comme méthode de diagnostic sérologique de la coqueluche.

En effet, la différence des résultats observés dans le groupe des coquelucheux et dans le groupe des témoins négatifs est significative.

Les anticorps apparaissent dans le sérum des malades à peu près en même temps que les quintes typiques - un peu

avant ou un peu après, selon les enfants - c'est-à-dire entre le dixième et le vingtième jour de la maladie environ. Leur titre s'élève jusqu'à 1/30 ou 1/90 le plus souvent.

- Cependant, plusieurs réserves doivent être formulées à propos de ces résultats.

- . Ils ont été acquis en utilisant au 1/20 la solution d'anticorps anti-gamma-globulines humaines dont les normes ont été précisées plus haut.

Il est possible qu'avec un conjugué différent, les résultats, en particulier les titres observés, soient différents.

Une des difficultés majeures de l'immuno-fluorescence en général et en particulier de l'immuno-fluorescence indirecte appliquée au diagnostic sérologique est sa médiocre reproductibilité.

Ce défaut relève de plusieurs facteurs, mais essentiellement des variations d'ordre physico-chimique (marquage) et d'ordre immunologique d'un sérum conjugué à un autre.

- . La méthode doit être quantitative, car une fluorescence modérée est observée quelquefois avec des sérums normaux pour des dilutions basses (1/10). Il faut donc exiger, (dans les conditions où nous avons opéré), au moins des titres de 1/30 ou 1/90 pour considérer le résultat comme positif.

Il serait encore préférable d'étudier un sérum prélevé précocément et un sérum prélevé tardivement, une augmentation du titre étant plus significative qu'un titre isolé.

- . L'apparition assez tardive des anticorps rend cette méthode peu intéressante pour le diagnostic de la maladie, en général cliniquement évidente à cette période.

Cependant, elle pourrait être utile pour confirmer le diagnostic d'une forme à symptomatologie atypique et peut-être pour le contrôle des vaccinations,

- . De toutes façons, avant de juger définitivement de sa valeur, nous nous proposons de l'appliquer sur une série plus importante de sérums et de la comparer avec les méthodes classiques de diagnostic sérologique de la maladie (agglutination et déviation du complément).

C O N C L U S I O N S

Nous rapportons les premiers résultats de notre étude sur les applications de la technique de l'immuno-fluorescence au diagnostic de la coqueluche.

Nous avons utilisé deux méthodes :

1° - La méthode directe consiste à rechercher les bacilles de BORDET-GENGOU dans les prélèvements pharyngés à l'aide d'une solution d'anticorps spécifiques conjugués à l'isothiocyanate de fluoresceine.

Cette méthode a déjà été utilisée par trois auteurs dont nous résumons les résultats publiés.

Nous décrivons ensuite le protocole de préparation de la solution d'anticorps conjugués que nous avons utilisée, de même que les résultats des vérifications de ses propriétés physiques et immunologiques.

Le mode de prélèvement adopté, de même que celui de la préparation des lames, le matériel optique employé pour leur examen, et les contrôles effectués sont précisés.

Les résultats de 60 prélèvements sont ensuite analysés. Ils ont été pratiqués chez des enfants hospitalisés pour coqueluche ou suspicion de coqueluche :

Treize enfants ne présentèrent finalement aucun symptôme clinique de coqueluche; les prélèvements de cette série furent tous négatifs.

Quarante-sept autres enfants présentaient une coqueluche cliniquement authentifiée avant ou après le prélèvement par des quintes typiques (sauf chez un d'entre eux où le diagnostic était seulement probable); dix-huit de ces enfants eurent un prélèvement positif.

Comme les auteurs précités l'ont signalé, les résultats positifs s'observent plus volontiers quand le prélèvement est effectué au début de la maladie (période catarrhale ou première semaine des quintes) et quand le sujet n'a pas reçu d'antibiotiques.

Ce n'était pas le cas de la majorité des 47 coqueluches de notre série. C'est sans doute une des raisons de la faible proportion de résultats positifs que nous avons observés.

L'autre raison est l'adoption de critères de positivité sévères dans l'interprétation des lames.

Nous avons en effet rencontré assez souvent des difficultés de lecture de celles-ci, dues à des fluorescences parasites non spécifiques, à la rareté ou à l'altération de la morphologie des germes dans certains cas.

Pour éviter les erreurs par excès qui nous ont semblé possibles, nous avons noté systématiquement ces prélèvements douteux comme négatifs.

Nous avons signalé enfin la réaction croisée de notre conjugué avec deux autres bactéries (B. PARAPERTUSSIS et F. BRONCHISEPTICA) due à des communautés antigéniques de ces germes avec BORDETELLA PERTUSSIS.

Malgré ces difficultés qui confèrent à la méthode un certain degré d'approximation, nous pensons, comme les auteurs qui l'ont déjà expérimentée, qu'elle peut cependant être utile pour le diagnostic de la coqueluche en période catarrhale.

2° - Nous avons également exploré les possibilités de l'immuno-fluorescence indirecte pour le diagnostic sérologique de la maladie.

Nous avons utilisé la technique suivante :

La préparation antigénique est constituée par des frottis de BORDETELLA PERTUSSIS en phase I. Des dilutions du 1/10 au 1/270 du sérum des sujets sont mises en contact. Les anticorps

fixés sont ensuite révélés par une solution d'anticorps anti-gamma-globulines humaines conjugués avec de l'isothiocyanate de fluoresceïne.

La préparation, les propriétés physiques et immunologiques de ce conjugué sont précisées. Nous avons montré qu'il n'était utilisable qu'à condition de l'épuiser au préalable avec une suspension de BORDETELLA PERTUSSIS (phase I) pour éliminer la fluorescence constatée après application directe de ce conjugué sur la préparation antigénique.

Cette méthode d'immuno-fluorescence indirecte a été utilisée pour rechercher les anticorps spécifiques du bacille de BORDET-GENGOU dans le sérum de trente-deux enfants.

Vingt d'entre eux étaient atteints de coqueluche. Leur sérum a été prélevé une ou deux fois à des périodes différentes de la maladie. Ce n'est qu'après une quinzaine de jours d'évolution de celle-ci, c'est-à-dire à peu près en même temps que les quintes typiques, qu'apparaissent, dans le sérum, des anticorps décelables par immuno-fluorescence. Ils s'élèvent à des titres de 1/30 à 1/90 en moyenne.

Par contre, les sérums de douze enfants ne présentant aucun antécédent ni aucun signe de coqueluche, et testés au titre de témoins négatifs, ne montrèrent aucune fluorescence, ou une fluorescence faible (à des titres ne dépassant jamais le 1/10), sauf un enfant récemment vacciné contre la coqueluche (1/30) et un autre ayant reçu récemment des gamma-globulines (1/30).

Il semble donc possible, à la lumière de ces résultats préliminaires, d'utiliser l'immuno-fluorescence indirecte comme méthode de diagnostic sérologique de la coqueluche.

Cependant, du fait de l'apparition assez tardive de titres significatifs, elle n'offre guère d'intérêt pour le diagnostic de la maladie, sauf peut-être dans les cas où la symptomatologie est atypique.

VU et permis d'imprimer :

LE RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS :

J. R O C H E

Le DOYEN de la FACULTE
de MEDECINE de PARIS :

G. C O R D I E R

Le PRESIDENT de la THESE :

R. B A S T I N

B I B L I O G R A P H I E

BRADFORD, W.L., SLAVIN, B.

Nasopharyngeal cultures in Pertussis.

Proc. Soc. EXP. BIOL. MED. 1940, 43, 590.

COCHRANE (Ch. G.)

La technique des anticorps fluorescents, applications
à la microbiologie et au phénomène d'Arthus.

Ann. Inst. Past. 1960, 99, 329-349.

COOK (M.K.), CHANOCK (R.E.), FOX (H.H.), HUEBNER (R.J.), BUESCHER
(E.L.), JOHNSON (R.T.)

Role of Eaton agent in disease of lower respiratory
tract. Evidence for infection in adults.

Brit. Med. J., 1960, I, 905-911.

COONS (A.H.), CREECH (H.J.), JONES (R.N.)

Immunological properties of an antibody containing a
fluorescent group.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1941, 47, 200-202.

COONS (A.H.), CREECH (H.J.), JONES (R.N.), BERLINER (E.)

The demonstration of Pneumococcal antigen in tissues
by the use of fluorescent antibody.

J. Immunol., 1942, 45, 159-170.

COONS (A.H.)

Labelled antigens and antibodies

Ann. Rev. Microbiol. 1954, 8, 333-352

DEACON (W.E.), FALCONE (V.H.), HARRIS (A.)

A fluorescent test for treponemal antibodies.

Proc. Soc. Exp. Med. Biol. N.Y., 1957, 96, 477-480.

DEACON (W.E.), PEACOCK (W.L.), FREEMAN (E.M.), HARRIS (A.)

Identifications of " Neisseria gonorrhoeae " by means of fluorescent antibodies.

Proc. Soc. Exp. Med. Biol. (N.Y.) 1959, 101, 322-325.

DE REPENTIGNY J., FRAPPIER A.

Studies on H. Pertussis liquid cultures.

III.- Localization of surface antigens by means of fluorescent antibody

CANAD. J. MICROBIOL. 1956, 2 : 677-683.

DONALDSON (P.), WHITAKER (J.A.)

Diagnosis of PERTUSSIS by fluorescent antibody staining of nasopharyngeal smears.

A.M.A.J. Dis. Child., 1960. 99, 423-427.

ELDERING G., EVELAND W.C., KENDRICK P.L.

Fluorescent antibody staining and agglutination reactions in BORDETELLA PERTUSSIS cultures.

J. BACT. , 1962, 83, 745-749.

GOLDMAN (M.), GORDON (M.A.), CARVER (R.K.)

Comparison of titres of dye and fluorescent inhibition tests in serologic diagnosis of toxoplasmosis.

Amer. J. Clin. Path., 1962, 37, 541-550.

GOLDSTEIN (G.), SLIZYS (I), MERRILL (W.C.) :

Studies on fluorescent antibody staining.

I.- Non specific fluorescence with fluorescein coupled sheep anti-rabbit globulines.

J. Exp. Med. 1961, 114; 89 - 110.

GOLDSTEIN G., SPALDING B.H., HUNT W.B. Jr.

Studies on fluorescent antibody staining.

II.- Inhibition by sub-optimally conjugated antibody globulines.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 111, 416-421

GOLDWASSER (R.A.), SHEPPARD (C.C.)

Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedure.

J. Immunol., 1958, 80, 122-131.

GOLDWASSER (R.A.), KISSLING (R.E.)

Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 1958, 92, 219-223.

KENDRICK (P.), ELMERING (G.), EVELAND (W.C.)

Fluorescent antibody techniques. Methods for identification of " Bordetella Pertussis ".

A.M.A.J. Dis. Child., 1961, 101, 149-154.

MAC DEVITT H.O., PETERS J.H., POLLARD L.W., HARTER J.G., COONS A.H.

Purification and analysis of fluorescein-labeled anti-sera by column chromatography.

J. Immunol., 1963, 90, 634-642.

MARIE, J., HERZOG, F.

Diagnostic de la coqueluche par la technique des anticorps fluorescents.

Bull. ACAD. NAT. MED., 1962, 146, 417-421.

MARIE, J., HERZOG, F., GAIFFE, M.

Le diagnostic rapide de la coqueluche par la technique des anticorps fluorescents (100 premiers résultats).

Semaine des Hôpitaux (Ann. Pédiatrie) 1963, 39, 269-272

MOODY (M.D.), ELLIS (E.C.), UPDYKE (E.L.)

Staining bacterial smears with fluorescent antibody.
Grouping streptococci in dried smears with fluorescent antibody.

J. Bact., 1958, 75, 553-560.

MOODY (M.D.), JONES (W.L.)

Identification of " corynebacterium diptheriae " with fluorescent antibacterial reagents.

J. Bact. 1963, 86, 225-293.

RIGGS (J.L.), SEIWALD (R.J.), BURCKALTER (J.H.), DOWNS (C.H.)

METCLAF (T.G.)

Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immuno-serum.

Am.J. Pathol., 1958, 34, 1081-1097.

WHITAKER (J.A.), PAGE (R.H.), STULBERG (C.S.), ZUELZER (W.W.)

Rapid identification of enteropathogenic " Escherichia coli " O.127-B.8 by the fluorescent antibody technique.

A.M.A.J. dis. child., 1958, 95 1- 8.

WHITAKER (J.A.), DONALDSON (P.), NELSON (J.D.)

Diagnosis of Pertussis by the fluorescent antibody method.

New England J. Med. 1960, 263, 850-851.

WHITAKER (J.A.), NELSON (J.D.), FINK (C.W.)

The fluorescent antitoxin test of the immediate diagnosis of diptheria.

Pediatrics, 1961, 27, 214-218.

Une Bibliographie complète sur la technique et les applications de l'immuno-fluorescence sera trouvée dans les revues générales et les ouvrages suivants :

- BASTIN R., LAFAIX CH.

L'immuno-fluorescence en pathologie infectieuse

Acquisitions médicales récentes - Journées médicales annuelles de BROUSSAIS - LA CHARITE -
1964, p.83-98 - L'EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANCAISE
PARIS, Ed.

- BEUTNER (E.H.)

Immunofluorescent staining : The fluorescent antibody method.

Bacteriological Reviews, 1961, 25 , 49-76

- COONS (A.H.) -

Antibodies and antigens labelled with fluorescein.
SCHWEIZ 'Z Pathol. U. Bakteriол., 1959,22, 693-699.

- COONS (A.H.)

The diagnostic application of fluorescent antibodies
SCHWEIZ Z. Pathol. U. Bakteriол., 1959, 22, 700-723.

- NAIRN (R.C.)

Fluorescent protein tracing
1962, E S Livingstone L T D
EDINBURGH and LONDON.
